



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA - UFPB
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAL -
PPGCAN

ANÁLISE GENÔMICA COMPARATIVA DE SALMONELLA ENTERICA
SOROVARES HEIDELBERG E TYPHIMURIUM DE ORIGEM AVÍCOLA

Sebastião Rodrigo de Lima Nascimento

Médico Veterinário

Areia-PB

Junho de 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA - UFPB
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAL -
PPGCAN

**ANÁLISE GENÔMICA COMPARATIVA DE SALMONELLA ENTERICA
SOROVARES HEIDELBERG E TYPHIMURIUM DE ORIGEM AVÍCOLA**

Sebastião Rodrigo de Lima Nascimento
Orientador: Prof. Dr. Oliveira Caetano de Freitas Neto
Coorientador: Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em Ciência
Animal da Universidade Federal da Paraíba
no Centro de Ciências Agrárias, Campus de
Areia, como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em Ciência
Animal.

Areia-PB
Junho de 2019

Catálogo na publicação

Seção de Catalogação e Classificação

N244a Nascimento, Sebastião Rodrigo de Lima.

ANÁLISE GENÔMICA COMPARATIVA DE SALMONELLA
ENTERICA
SOROVARES HEIDELBERG E TYPHIMURIUM DE ORIGEM AVÍCOLA /
Sebastião Rodrigo de Lima Nascimento. - Areia, 2019.
48 f. : il.

Orientação: Oliveira Caetano de Freitas Neto.
Coorientação: Celso José Bruno de Oliveira.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCA.

1. Resistência bacteriana. 2. Salmonella não tifóide.
3. WGS. 4. Saúde pública. I. Freitas Neto, Oliveira
Caetano de. II. Título.

UFPB/BC

SEBASTIÃO RODRIGO DE LIMA NASCIMENTO

**ANÁLISE GENÔMICA COMPARATIVA DE *SALMONELLA*
ENTERICA SOROVARES HEIDELBERG E TYPHIMURIUM DE
ORIGEM AVÍCOLA**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal do Centro de Ciências
Agrárias da Universidade Federal da
Paraíba, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre
em Ciência Animal. Área de
Concentração Saúde Animal no Brejo
Paraibano.

APROVADA EM 26/06/2019

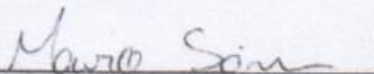
BANCA EXAMINADORA



Dr. CELSO JOSÉ BRUNO DE OLIVEIRA
UFPB
Coorientador



Dr. ALEXANDRE LEMOS DE BARROS MOREIRA FILHO
UFRO
Examinador



Dr. MAURO DE MESQUITA SOUZA SARAIVA
UNESP
Examinador

DADOS CURRICULARES

Sebastião Rodrigo de Lima Nascimento, filho de Roberto Jorge do Nascimento e Maria do Socorro de Lima Nascimento, nascido em 08 de fevereiro de 1992, na cidade de Esperança-PB, Ingressou no curso Bacharel em Medicina Veterinária em 2010 no Centro de Ciências Agrárias-CCA na Universidade Federal da Paraíba-UFPB e diplomado no ano de 2016. Em 2017 ingressou no Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Animal na UFPB.

À Deus, aos meus Pais, minha
namorada, sobrinhas e a todos os animais,
em especial Belinha, uma labradora que por
doze anos me demonstrou pureza e lealdade.

Dedico

Banca Examinadora:

Dr. Celso José Bruno de Oliveira (Presidente).

Dr. Mauro de Mesquita Souza Saraiva.

Dr. Alexandre Lemos de Barros Moreira Filho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelas bênçãos derramadas em minha vida e sobre minha família e toda sabedoria fornecida, a Nossa Senhora por nos proteger com seu manto Sagrado e sempre interceder.

Aos meus Pais, Roberto e Socorro por serem meus maiores incentivadores, por nunca me deixarem desistir e sempre me darem apoio físico, psicológico e financeiro, além de toda educação me fornecida com seus exemplos.

A minha namorada Anne Caroline, por ser minha inspiração e homeostasia, sempre me apoiando perante os obstáculos e comemorando nas conquistas, juntamente com seus familiares.

Meus irmãos, Ricardo e Rogério por não hesitarem em me ajudar sempre q a eles recorro, as minhas sobrinhas Livia e Sofia, que, com suas purezas e alegria me tornam mais feliz e motivado a seguir em frente. As minhas cunhadas Simone e Moniky que sempre me incentivam. A minha Vó Carminha e a todos os familiares que de alguma maneira auxiliam em minha formação.

Aos meus familiares que do Céu intercedem, meus avôs Joca e Janúncio, Vó Rosália, Tia Laurita, Tia Antônia, Tio Zé e demais familiares. Também aos amigos Niedson Gutemberg, Victor, Marcos Vaqueiro e Guilherme. Eternas Saudades.

Por todos animais de estimação que já tive e que tenho, seres puros que carregam consigo o dom de amar, mostrando que vale a pena lutar por essa profissão e pelo bem de todos esses seres.

Aos Professores Dr. Oliveira de Freitas Neto pela atenção fornecida desde minha aprovação ao mestrado e sempre compartilhando de seus conhecimentos e o Dr. Celso José Bruno de Oliveira pelos ensinamentos repassados e ajuda, sempre incentivando para um crescimento profissional e pessoal. Honrado por ser orientado e coorientado por essas grandes referências. Estendo meus agradecimentos a todos os professores do LAPOA e do PPGCAN.

Grato a Núbia, Priscylla, Pavlos e Mauro, por não medirem esforços para me ajudar, e a todos que fazem parte do LAPOA-CCA, que direta ou indiretamente contribuíram em minha formação.

Colegas, Professores e secretários do PPGCAN que se dedicam para o crescimento desse Programa e que tornam o meio acadêmico mais prazeroso e divertido. Gratidão.

A todos os amigos e colegas que conheci durante toda minha vida e que de certa forma deixaram algum ensinamento.

Muito Obrigado!

EPÍGRAFE

“Ter Fé não significa estar livre de momentos difíceis, mas ter a força para os enfrentar sabendo que não estamos sozinhos.”

Papa Francisco

RESUMO

A avicultura é uma atividade de importância mundial. Os Estados Unidos da América e o Brasil ocupam, respectivamente, as duas primeiras posições na produção mundial de frango. A presença de isolados do gênero *Salmonella* multirresistentes na carne de frango é motivo de preocupação para as autoridades de saúde pública e animal, prejudicando a imagem e qualidade desse alimento. No presente estudo, foram selecionados 14 genomas públicos de *Salmonella*, retirados da plataforma do NCBI, sendo 8 sorotipos de Heidelberg (SH), e 6 de Typhimurium (STM), oriundos do Brasil e dos Estados Unidos. Esses isolados foram comparados com o propósito de avaliar conjuntos de genes relacionados à resistência antimicrobiana desses microrganismos. Os resultados apresentaram a presença de genes relacionados a insensibilidade aos antimicrobianos, com frequência elevada para aminoglicosídeos (*aac(6')-Iaa*) 100%, fosfomicina (*fosA7*) 50% (7 SH, 3 do Brasil e 4 dos EUA), às tetraciclina *tet(A)* e sulfonamidas (*Sul2*) 50% (3 SH do Brasil e 4 STM, 1 do Brasil e 3 dos EUA) e 14,28% à betalactâmicos (*blaCMY-2*) (2 SH do Brasil). Apenas 3 isolados não apresentaram plasmídeo, enquanto os demais (11) apresentaram no mínimo um plasmídeo. Dentre estes foram identificados *ColpVc*, *IncX1*, *IncA2*, *IncI1*, *IncFIB(S)* e *IncFII(S)*. Às Ilhas de patogenicidade de *Salmonella* (SPI), as SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4 e SPI-5 foram encontradas em todos os isolados estudados, apesar de algumas apresentarem baixa homologia em comparação com o genoma referência (SPI), sendo 4 SH e 1 STM do Brasil e 2 STM dos EUA. A construção da árvore filogenética permitiu agrupar os isolados em 3 *clades* que variaram entre os sorotipos e países de onde foram isolados. SH encontrada no Brasil apresentou mais genes de resistência quando comparadas às isoladas nos Estados Unidos e aos isolados de STM.

Palavras Chave: Resistência bacteriana, *Salmonella* não tifoide, WGS, Saúde Pública.

ABSTRACT

Poultry farming is an activity of global importance. The United States of America and Brazil hold respectively the top two positions in world chicken production. The presence of multiresistant *Salmonella* isolates in chicken meat is a cause of worldwide concern for the public and animal health authorities, damaging the image and quality of this food. In the present study, 14 public genomes of *Salmonella* were selected from the NCBI platform: 8 Heidelberg (SH) and 6 Typhimurium (STM) serotypes originating from Brazil and the United States. These isolates were compared for the purpose of evaluating gene sets related to the antimicrobial resistance of these microorganisms. The results showed the presence of genes related to antimicrobial insensitivity, with high frequency for aminoglycosides (aac - laa) 100%, fosfomycin (fosA7) 50% (7 SH, 3 from Brazil and 4 from the USA), tetracycline tet(A) and sulfonamides (Sul2) 50% (3 SH from Brazil and 4 STM, 1 from Brazil and 3 from the USA) and 14.28% for beta-lactams (blaCMY-2)(2 SH from Brazil). Only 3 samples did not present a plasmid, whereas the rest of the isolates (11) had at least one plasmid. Among these, ColpVc, IncX1, IncA2, IncI1, IncFIB(S) and IncFII(S) were identified. Regarding the pathogenicity islands of *Salmonella* (SPI), SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4 and SPI-5 were found in all observed genomes, although some had low homology compared to the genome reference (*Salmonella*SPI), with 4 SH and 1 STM from Brazil and 2 STM from the USA. Building the phylogenetic tree allowed to group the isolates into 3 clades that varied between the serotypes and countries from which they were isolated. SH cells found in Brazil showed more resistance genes when compared to those isolated in the United States and to STM isolates.

Keywords: Antimicrobial resistance, Nontyphoidal *Salmonella*, WGS, Public Health.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. Objetivo Geral	18
2.2. Objetivos Específicos.....	18
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
3.1. Gênero Salmonella - Aspectos Gerais.....	19
3.2. Salmonelose Humana por Salmonella Typhimurium e Salmonella Heidelberg.....	20
3.3. Resistência a Antimicrobianos.....	21
3.4. Análise do Genoma de <i>Salmonella</i>	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1. Genomas Utilizados.....	24
4.2. Análise dos Genomas.....	25
5. RESULTADOS.....	27
5.1. Genes de Resistência Aos Antibióticos.....	27
5.2. Presença de Plasmídeos.....	29
5.3. Presença de SPI.....	30
5.4. Análise Filogenética.....	31
6. DISCUSSÃO.....	32
7. CONCLUSÃO.....	36
8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela 1. Identificação das amostras oriundas do *National Center Biotechnology Information* (NCBI)..... 24

Tabela 2: Genes de resistência a antimicrobianos e Plasmídeos..... 27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.: Exemplo de código das amostras analisadas.....	25
Figura 2: Diagrama de Venn com amostras de SH e STM do Brasil e EUA reperentadas por código e distribuídas em cinco conjuntos (círculos sobrepostos) que representam as classes dos antimicrobianos.....	28
Figura 3: Diagrama de Venn representando as amostras codificadas de SH e STM relacionadas de acordo com a presença ou ausência dos plasmídeos.....	29
Figura 4: <i>Ring-graphic</i> da presença das ilhas de patogenicidade entre 9 <i>Salmonellas</i> , sendo 4 SH na cor roxo e 5 STM na cor verde, tanto dos EUA quanto do Brasil. Intensidades das cores representam porcentagem de identidade com cepa de referência (SPI).....	30
Figura 5: Análise filogenética de 14 amostras de <i>S. Heidelberg</i> identificadas em roxo e <i>S. Typhimurium</i> na cor verde. Todas estão identificadas por um código que descreve o sorovar, isolado e País; isolado em azul refere-se à cepa-referência utilizada para montagem da árvore filogenética.....	31

1. INTRODUÇÃO

A carne de frango constitui um importante produto alimentício no Brasil, seja do ponto de vista nutricional quanto comercial. Dados de 2018 apontam que o país é o quarto lugar no mundo em consumo de frango (9,866 mil Toneladas), e o segundo lugar em produção (13,550 mil Toneladas). Esses números contribuem para que o Brasil se encontre em primeiro lugar no ranking de exportação de alimentos com 3,685 mil toneladas exportados no último ano (USDA, 2019). Até o final de 2019 as estimativas se mantêm, segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (2019), devido aos avanços tecnológicos em melhoramento genético, nutrição e sanidade animal que impulsionam o crescimento da produção avícola (BATISTA, 2013).

Desde a década de 90, surgiram relatos de surtos de infecções alimentares em humanos por ingestão de produtos de origem avícola (TAUNAY et al., 1996). Desde então, a carne de frango permanece identificada como uma das principais fontes de transmissão de microrganismos para humanos especialmente bactérias do gênero *Salmonella* (FINSTAD, et al., 2012). Essa espécie é reconhecida como um dos principais patógenos de origem alimentar para humanos e animais, causando doenças de gravidade variada e gerando custos médicos elevados (LEE, et al, 2015).

Salmonella sp. é o gênero de maior relevância pertencente à família das *Enterobacteriaceae*, composto por duas espécies, *S. enterica*, que por sua vez subdivide-se em 6 subespécies e *S. bongori* (RODRIGUES, 2011). A subespécie *entérica* compreende mais de 2600 sorotipos descritos, muitos dos quais causam infecções em humanos e em várias espécies de animais (MAJOWICZ, 2010; LAN et al., 2009). As *Salmonellas* são responsáveis por causarem relevantes casos de diarreias em seres humanos. Os quadros variam desde casos leves a fatais, preocupando as autoridades de saúde pública ao redor do mundo (WHO, 2018).

Dentre os sorotipos mais envolvidos em casos de infecção alimentar em humanos, estão *S. Typhimurium* (STM) e *S. Heidelberg* (SH) (CDC, 2016). SH é relativamente mais invasiva, causando infecções com maior gravidade quando comparada a outros sorotipos (CDC., 2006). STM, é um dos sorotipos mais frequentemente isolados em alimentos e em casos clínicos de humanos e animais (LAN et al. 2009; PROROGA et al., 2016).

Nos últimos anos observou-se elevação na frequência de isolamento de SH com perfis de multiresistência nos plantéis de frangos de corte e na carne de frango produzidas no Brasil (VOSS-RECH et al., 2015; FITCH et al., 2016), despertando preocupação nas autoridades de saúde pública e veterinária. Ao mesmo tempo, nos Estados Unidos, isolados de SH de origem avícola resistentes a várias classes de antibióticos vem provocando surtos graves de infecção alimentar, provavelmente devido a utilização dos antibióticos de forma indiscriminada (GIERALTOWSKI et al., 2016; CDC, 2014; CDC 2018; O'NEILL, 2016). O mesmo acontece para as STM que tem apresentado surgimento significativo de cepas diversificadas resistentes a múltiplas drogas (WANG et al., 2019).

Por esse motivo, estudos epidemiológicos que permitam identificação e ajudem no controle destes patógenos estão sendo realizados, e utilizando ferramentas para sequenciamento de nova geração a exemplo do *Whole Genome Sequence* (WGS), que visa identificar genes de resistência, semelhança evolutiva entre espécies e variações gênica (CDC, 2018; MCDERMOTT et al., 2016; DELGADO-SUÁREZ et al., 2018; SONDA et al., 2018; ALMEIDA et al., 2018; MCMILLAN et al., 2019). Diante da relevância de *Salmonella* spp. para a saúde pública e veterinária e da necessidade de melhor compreender as informações genéticas ligadas à patogenicidade e à resistência antimicrobiana de sorotipos emergentes, como SH e STM elaborou-se o presente estudo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

Analisar os perfis de resistência dos genomas de *Salmonella enterica* Subsp. *enterica* sorotipo Heidelberg e Typhimurium de origem avícola, oriundos do *National Center Biotechnology Information* (NCBI), isolados nos Estados Unidos e no Brasil.

2.2. Objetivos Específicos:

- Analisar a presença de genes de resistência a antimicrobianos nos genomas sequenciados.
- Identificar a presença de plasmídeos em cada amostra.
- Analisar a variação genotípica através da árvore filogenética.
- Identificar as ilhas de patogenicidade.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Gênero *Salmonella* - Aspectos Gerais

O gênero *Salmonella* foi assim nomeado em homenagem a Daniel Elmer Salmon, veterinário americano e pesquisador do United States Department of Agriculture - USDA, foi um dos responsáveis pelo isolamento deste agente, assim, o organismo recebeu o seu nome (OLDENKAMP, 2004). Entre as Enterobacteriaceae, o gênero *Salmonella* encontra-se como sendo o de maior relevância e divide-se em duas espécies, *Salmonella enterica* (*S. enterica*), *Salmonella bongori* (*S. bongori*). A *S. enterica* é subdividida em subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (RODRIGUES, 2011).

S. enterica possui mais de 2600 sorotipos atualmente descritos (MAJOWICZ, 2010), caracterizados como bacilos curtos Gram-negativos não esporulados, medindo entre 0,7 a 1,5 x 2,5 µm, e, na grande maioria, são móveis com flagelos peritríquios. A temperatura de multiplicação varia entre 5 e 45°C, sendo 37°C a ideal, o pH 7 (podendo variar entre 4 e 9), em meios de cultura próprios para enterobactérias (HOLT, 1994; GAST, 1997).

As bactérias do gênero *Salmonella* são aeróbias ou anaeróbias facultativas, que, bioquimicamente, são capazes de metabolizar nutrientes, catabolizando D-glicose ou outros carboidratos, exceto lactose e sacarose, com produção de ácido e gás. Assim como os demais membros dessa família, são catalase positiva e oxidase negativa. Não produzem indol, não fermentam malonato, não hidrolisam a uréia, utilizam citrato como fonte de carbono, reduzem nitrato a nitrito e podem produzir ácido sulfídrico (DICKEL, 2004).

Segundo MALDONADO (2008), outra característica presente entre os isolados de *Salmonella* é a capacidade de aderir a superfícies, formando um tipo de “biofilme”. Esse gênero já apresentou diversas modificações em sua nomenclatura e taxonomia, que as classificam de acordo com sua epidemiologia, reações bioquímicas e estruturas antigênicas.

A *Salmonella entérica* na maioria dos casos causa infecções entéricas, podendo ser localizada ou generalizada dependendo da virulência do sorotipo envolvido, no qual o agente ultrapassa a mucosa intestinal, e ativa mecanismos de virulência ao invadir os fagócitos permitindo sua sobrevivência e assim replicam-se. A invasão ao

epitélio acontece também pelo transporte através do epitélio intacto, as células M, Paneth, Criptas e enterócitos absortivos podem ser encontradas na mucosa intestinal e são consideradas portas de entrada para o patógeno. O acometimento em órgãos como o baço e fígado acontece através da migração dos fagócitos, o que, facilita a disseminação da bactéria, promovendo septicemia e até óbito (OHL; MILLER, 2001; VAN ASTEN et al., 2005).

Salmoneloses são doenças oriundas da ingestão por alimentos contaminados (CARDOSO e CARVALHO, 2006). Os principais veículos de transmissão são alimentos de origem animal, sendo o frango e o ovo entre os mais investigados (SHINOHARA et al., 2008) dessa forma, alimentos de origem animal, particularmente a carne de frango, representam papel fundamental na epidemiologia das salmoneloses humanas, podendo tornar-se um problema potencial na determinação de quadros de infecção alimentar em seus consumidores (CARVALHO, 2005).

3.2. Salmonelose Humana por *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Heidelberg

Surtos de salmoneloses são relevantes no Brasil e nos Estados Unidos da América. Entre os sorotipos de *Salmonellas* de importância na saúde pública, podemos citar SH e STM (Brasil, 2018; CDC, 2016). Suas tipificações são baseadas no fenótipo e no genótipo (FOLEY et al., 2009). No Brasil, desde 1962, SH tem sido identificada em aves e produtos derivados (HOFER et al., 1997). Este sorotipo também é muito isolado na avicultura no Canadá e de grande importância no Estados Unidos (CHITTICK et al., 2006; CDC, 2016).

DICKEL (2004) avaliou abate de frangos em três matadouros no Sul do Brasil e relatou a incidência de *Salmonella* spp. em 26,11% das carcaças analisadas, sendo que destes, 63,9% corresponderam ao sorotipo Heidelberg. Enquanto que BONI (2011) identificou *S. Typhimurium*, como um dos sorotipos de maior ocorrência em seu estudo realizado em aviários e frigoríficos no Mato Grosso do Sul e de importância no mundo (CDC, 2016). No estado de Goiás, REZENDE et al. (2005) identificou a SH e STM entre os cinco sorotipos mais relevantes em carcaças de frango.

A STM é mais comumente encontrado como salmonelose em humanos (PROROGA et al., 2016). Desde 1940, tem-se registrado o rápido aumento de salmonelas não específicas de humanos e animais, particularmente *Salmonella* Typhimurium (CARDOSO, 2008).

Estes sorotipos de *Salmonella* são relevantes para saúde pública e animal, pois genes de resistência em alguns estudos vem sendo frequentemente encontrados (Pandini, 2014; WHO, 2018; CDC, 2018).

3.3. Mecanismos de Resistência a *Salmonellas*

Na maioria dos surtos de Salmonelose são provocados por SH e STM estão associados a cepas resistentes a antimicrobianos, devido a presença de genes que lhes conferem a habilidade de resistir na presença desses fármacos (CDC, 2014; CDC 2018; PANDINI 2014). O surgimento de resistência nessas bactérias deve-se ao uso indiscriminado destes antimicrobianos, que favorecem a multiplicação de cepas resistentes (O'NEILL, 2016; Anvisa, 2018; WHO, 2018). Os dados do Centro de Controle de Doenças (CDC) dos Estados Unidos estimam que mais de 2 milhões de infecções são acometidas por bactérias resistentes, resultando em mais de 23.000 mortes por ano e até 2050 aproximadamente 10 milhões de pessoas serão fatalmente afetadas anualmente (CDC, 2014; WHO, 2019).

Com o intuito de facilitar levantamentos e consequentemente discussões sobre resistência antimicrobiana, em 1996, nos Estados Unidos da América (EUA), foi criado o “Sistema Nacional de Monitoramento da Resistência Antimicrobiana” (NARMS) com o propósito de promover a saúde pública (FDA, 2018). Outra plataforma foi criada através da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2015, o GLASS (Sistema Global de Vigilância de Resistência Antimicrobiana) com objetivo também de apoiar a vigilância e pesquisas na temática de resistência antimicrobiana. Com isso, o Brasil se comprometeu a integrar e repassar dados ao sistema desde de 2018. (OPAS/WHO, 2018).

SH e STM estão entre os de maior importância nos EUA e Brasil. Estes sorotipos são de grande relevância a saúde pública e estão entre os mais identificados no Brasil, podendo apresentar genes de resistência a antibióticos. (PANDINI 2014; SOUZA, 2015; WHO, 2018; CDC, 2014). Caso não seja implementado normas de controle eficiente no combate as resistências antimicrobianas, estima-se que em 2050 aproximadamente 10 milhões de pessoas no mundo morrerão anualmente devido as infecções que irão matar mais que o câncer, além dos gastos que poderão chegar a 100 bilhões de dólares ao ano (O'NEILL, 2016).

Por esses motivos, estudos estão sendo realizados na busca de identificar os genes que caracterizam resistência as *Salmonellas*. A exemplo do gene *tetA* que confere resistência a classe das tetraciclina e o gene *Sul2* responsável por fornecer resistência as Sulfonamidas e que são bastante identificados em isolados de STM e SH (ALMEIDA et al., 2018; IZUMIYA, et al., 2011; DEBLAIS et al., 2018). De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (2007), a resistência às tetraciclina acontece por diminuição da acumulação da droga no interior da célula, e para as sulfonamidas por mutação, aumentando à produção de ácido para-aminobenzóico ou de diidropteróico sintetase que apresentam pouca afinidade pelo antimicrobiano. Ambos podendo ser mediada por genes cromossômicos ou Plasmídeo.

Gene *aac(6')/laa* gera resistência a classe dos aminoglicosídeos através da alteração dos sítios de ligação no ribossomo, alteração na permeabilidade e/ou modificação enzimática da droga. Resistência aos Beta-Lactâmicos, acontece por meio de alguns genes, dentre eles o gene *blaCMY-2* que, promove a produção de beta-lactamases (o mais eficiente na promoção da resistência a essa classe) ou diminuição da permeabilidade bacteriana ao antimicrobiano através de mutações e modificações nas porinas, proteínas que permitem a entrada de nutrientes e outros elementos para o interior da célula. Os genes são identificados em *Salmonellas* (PANDINI, 2014; ANVISA, 2007; POOLE, 2007).

Salmonella expressa vários genes de virulência, alguns contidos no cromossomo bacteriano, em ilhas de patogenicidade (SPI's), outros situados em plasmídeos de virulência (STERZENBACH et al., 2013). As SPI-1 e SPI-2 são as mais bem estudadas e caracterizadas, embora outras começaram a ter função elucidada em sorotipos específicos (MARCUS et al., 2000; BLONDEL et al., 2010; STERZENBACH et al., 2013).

A SPI-1 tem aproximadamente 40 kilopares de bases (Kb) e, de acordo com DESAI et al. (2013), é uma das mais antigas aquisições genéticas, ao lado das SPI-4 e SPI-5, a possibilitar a emergência dos membros do gênero *Salmonella* como patógenos. A SPI-1 codifica o sistema de secreção do tipo três (Type Three Secretion System – T3SS-1), uma estrutura especializada em forma de agulha que permite a injeção de proteínas bacterianas efetoras no citoplasma das células do hospedeiro com o propósito de manipular os sinais celulares levando, dessa forma, ao rearranjo do citoesqueleto e a captação do patógeno por micropinocitose (BÄUMLER;

HEFFRON, 2000; MARCUS et al., 2000). Essas proteínas promovem a colonização e invasão das células epiteliais e a indução de inflamação nos intestinos do hospedeiro (BÄUMLER; HEFFRON, 2000; HAPFELMEIER et al., 2005; RAFFATELLU et al., 2005; MÜLLER et al., 2009).

Mais tarde, ao longo de sua evolução, *Salmonella* incorporou em seu cromossomo outro pacote de genes compilados na denominada SPI-2 (DESAI et al., 2013). Esse conjunto gênico teria habilitado o micro-organismo a sobreviver e se replicar no interior das células fagocíticas do hospedeiro (MARCUS et al., 2000; WATERMAN; HOLDEN, 2003; BUCKNER et al., 2011; FIGUEIRA; HOLDEN, 2012).

Devido as resistências aos antibióticos, variadas bactérias patogênicas de diferentes isolados no mundo estão sendo estudadas quanto aos seus genomas com a utilização de ferramentas tecnológicas a exemplo do Whole Genoma sequence (WGS), avaliando suas similaridades e distinções (WASYL et al., 2014; PANZENHAGEN et al., 2018; LIU, 2019; GIANECINI et al., 2019; YANG et al., 2019; SUÁREZ et al., 2019).

3.4. Análise do Genoma de *Salmonella*

O *Whole Genome Sequencing* (WGS) tem se tornado cada vez mais acessível, possibilitando seu uso em diagnósticos e na tipagem molecular de patógenos (TASMIN et al., 2017). De acordo com HOFFMANN et al. (2014), o WGS seria o método mais confiável para distinguir isolados de surtos provocados por *Salmonella* spp., pois permite a detecção de alterações em poucos nucleotídeos entre estirpes aparentemente clonais. Aliado a isso, o WGS proporciona a visualização do genoma bacteriano com alto grau de resolução, permitindo não só comparações com propósitos epidemiológicos, mas também a detecção de genes de resistência a antimicrobianos, a visualização de alterações estruturais ligadas a evolução dos microrganismos e aquisição de características de virulência (WALKER et al., 2013).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Genomas Utilizados

Foram utilizados 14 genomas do banco público *National Center Biotechnology Information* (NCBI), de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovares Typhimurium (STM) e Heidelberg (SH) oriundas do Brasil e dos Estados Unidos: 8 amostras de SH (4 do Brasil e 4 dos Estados Unidos), e 6 amostras de STM (2 do Brasil e 4 dos Estados Unidos). Todos os isolados foram codificados de acordo com o sorotipo, local de isolamento, país e de acordo com seu *Sequence Read Archive* (SRA) (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação das amostras oriundas do *National Center Biotechnology Information* (NCBI).

CODIGO	SRA	ISOLADO	LOCALIZAÇÃO	ANO	SOROVAR	COBERTURA
SHBCB-960	SRR7064960	Broiler Chicken	Brazil	2016	S. Heidelberg	83,38
SHBCB-005	SRR7065005	Broiler Chicken	Brazil	2016	S. Heidelberg	85,55
STBCB-027	SRR7221027	Broiler Chicken	Brazil	2016	S. Typhimurium	69,67
STBCB-007	SRR6787007	Broiler Chicken	Brazil	2016	S. Typhimurium	89,31
SHCCB-567	SRR7130567	Carcass Chicken	Brazil	2016	S. Heidelberg	76,2
SHCCB-003	SRR7232003	Carcass Chicken	Brazil	2016	S. Heidelberg	73,69
SHCCEU-357	SRR6848357	Chicken Carcass	EUA/NY	2018	S. Heidelberg	81,58
SHCCEU-151	SRR6374151	Chicken Carcass	EUA/TX	2017	S. Heidelberg	125,03
SHCCEU-636	SRR7782636	Chicken Carcass	EUA/AR	2018	S. Heidelberg	106,69
SHCCEU-480	SRR8113480	Chicken Carcass	EUA/NC	2018	S. Heidelberg	82,14
STCCEU-061	SRR7810061	Chicken Carcass	EUA/RI	2018	S. Typhimurium	95,67
STCCEU-360	SRR7695360	Chicken Carcass	EUA/FL	2018	S. Typhimurium	101,53
STCCEU-687	SRR7822687	Chicken Carcass	EUA/MS	2018	S. Typhimurium	91,59
STCCEU-645	SRR5125645	Chicken Carcass	EUA/FL	2016	S. Typhimurium	114,38

Os códigos das amostras estão compostos por letras maiúsculas e números, sendo as duas primeiras letras referentes ao sorotipo, (SH = *Salmonella* Heidelberg; ST = *Salmonella* Typhimurium), as duas letras seguintes fazem referência ao local de isolamento (BC = Broiler Chicken; CC=Carcass Chicken) e por fim, as últimas letras referenciam o País de isolamento (B = Brasil; EU = Estados Unidos). A sequência de letras é seguida de três números, separados por hífen, que correspondem aos três

últimos dígitos do *Sequence Read Archive* (SRA) no NCBI no momento das escolhas destas amostras (Figura 1).

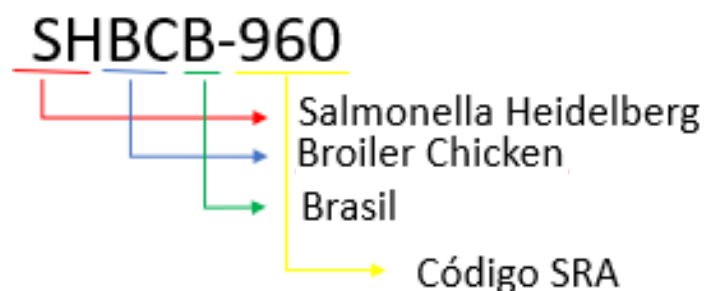


Figura 1.: Exemplo de código das amostras analisadas.

A qualidade dos isolados selecionados foi avaliada com o uso do *software* FastQC (ANDREWS, 2010; LEGGET et al., 2013). A limpeza desses isolados foi feita com o auxílio do Trimmomatic (BOLGER, 2014), com objetivo de retirar os adaptadores utilizados no sequenciamento, contaminantes e fragmentos de baixa qualidade. Após a análise de qualidade, os genomas foram montados a partir do *software* digital PATRIC (<https://www.patricbrc.org/>) (WATTAM, 2014), e anotados na plataforma *online* do Rast (<http://rast.theseed.org/FIG/rast.cgi>) (AZIZ, et al., 2008).

4.2. Análise dos Genomas

Os arquivos obtidos (contigs) com a montagem dos isolados, foram utilizados para a investigação quanto a presença de genes de resistência a antimicrobianos (ResFinder) (ZANKARI, 2012) e a existência e identificação de plasmídios (PlasmidFinder) (CARATTOLI, 2014), no servidor da web *Center for Genomic Epidemiology* (CGE) (<http://www.genomicepidemiology.org/>). Para a presença de ilhas de patogenicidade em *Salmonella*, utilizou-se dois modelos de análise, o SPIFinder (ROER et al., 2016), ainda na plataforma online do CGE; e o BRIG, para a existência das SPIs 1-5, assim como sua composição gênica, aplicando como referência a *Salmonella*SPI. Em seguida, esses resultados foram apresentados em forma de gráfico, utilizando o Gerador de Imagem de Anel por BLAST (ALIKHAN et al., 2011).

A análise filogenética foi realizada utilizando o CSIPhylogeny no servidor do CGE (KAAZ ET AL., 2014), como referência foi utilizado o genoma completo da *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Typhi str. CT18, posteriormente foi editada no software FigTree (RAMBAUT, 2010). Utilizando-se a plataforma do LucidChart (lucidchart.com) foi realizado dois diagramas de Venn, ambos representando as amostras de SH e STM codificadas. Porém, um foi gerado para a resistência aos antimicrobianos e outro para os plasmídeos.

5. RESULTADOS

5.1. Genes De Resistencia Aos Antibióticos

Foram identificados genes responsáveis por resistência a cinco classes de antimicrobianos. O gene *aac(6')-Iaa*, que confere resistência aos aminoglicosídeos, foi identificado em todos os isolados. A resistência à fosfomicina (*fosA7*) foi identificado em 50% das amostras (7 SH, sendo 3 do Brasil e 4 dos EUA). Os genes de resistência *tet(A)* para tetraciclinas e *Sul2* para sulfonamidas foram identificados em 50% dos isolados (3 SH do Brasil e 4 STM sendo 1 do Brasil e outras 3 dos EUA). Resistência aos betalactâmicos (*blaCMY-2*) foi identificado em 14,28% (2 SH do Brasil). Representação dos resultados em tabela 2 e figura 2.

Tabela 02: Genes de resistência a antimicrobianos e plasmídeos.

AMOSTRA	CLASSE	GENE DE RESISTÊNCIA	PLASMÍDEO
SHBCB - 960	Aminoglicosídeos	<i>aac(6')Iaa</i>	ColpVC
	Beta-Lactâmicos	<i>blaCMY-2</i>	IncA/C2
	Fosfomicina	<i>fosA7</i>	IncI1
	Sulfonamida	<i>sul2</i>	IncX1
	Tetraciclina	<i>tet(A)</i>	-
SHBCB - 005	Aminoglicosídeo	<i>aac(6')-Iaa</i>	ColpVC
	Fosfomicina	<i>fosA7</i>	IncA/C2
	Sulfonamida	<i>sul2</i>	IncX1
	Tetraciclina	<i>tet(A)</i>	-
STBCB – 027	Aminoglicosídeo	<i>aac(6')-Iaa</i>	IncFIB(S)
STBCB – 007			IncFII(S)
	Aminoglicosídeo	<i>aac(6')-Iaa</i>	IncA/C2
	Sulfonamida	<i>sul2</i>	IncI1
	Tetraciclina	<i>tet(A)</i>	-
SHCCB - 567	Aminoglicosídeo	<i>aac(6')-Iaa</i>	ColpVC
	Beta-Lactâmico	<i>blaCMY-2</i>	IncA/C2
	Fosfomicina	<i>fosA7</i>	IncI1
	Sulfonamida	<i>sul2</i>	IncX1
	Tetraciclina	<i>tet(A)</i>	-
SHCCB - 003	Aminoglicosídeo	<i>aac(6')-Iaa</i>	-

SHCCEU - 357	Aminoglicosídeo	aac(6')-laa	Incl1
	Fosfomicina	fosA7	IncX1
SHCCEU - 151	Aminoglicosídeo	aac(6')-laa	ColpVC
	Fosfomicina	fosA7	IncX1
SHCCEU - 636	Aminoglicosídeo	aac(6')-laa	ColpVC
			Incl1
	Fosfomicina	fosA7	IncX1
SHCCEU - 480	Aminoglicosídeo	aac(6')-laa	ColpVC
	Fosfomicina	fosA7	IncX1
STCCEU - 061	Aminoglicosídeo	aac(6')-laa	-
	Sulfonamida	sul2	-
	Tetraciclina	tet(A)	-
STCCEU - 360	Aminoglicosídeo	aac(6')-laa	IncA/C2
	Sulfonamida	sul2	-
	Tetraciclina	tet(A)	-
STCCEU - 687	Aminoglicosídeo	aac(6')-laa	-
STCCEU- 645	Aminoglicosídeo	aac(6')-laa	ColpVC
	Sulfonamida	sul2	IncA/C2
	Tetraciclina	tet(A)	IncX1

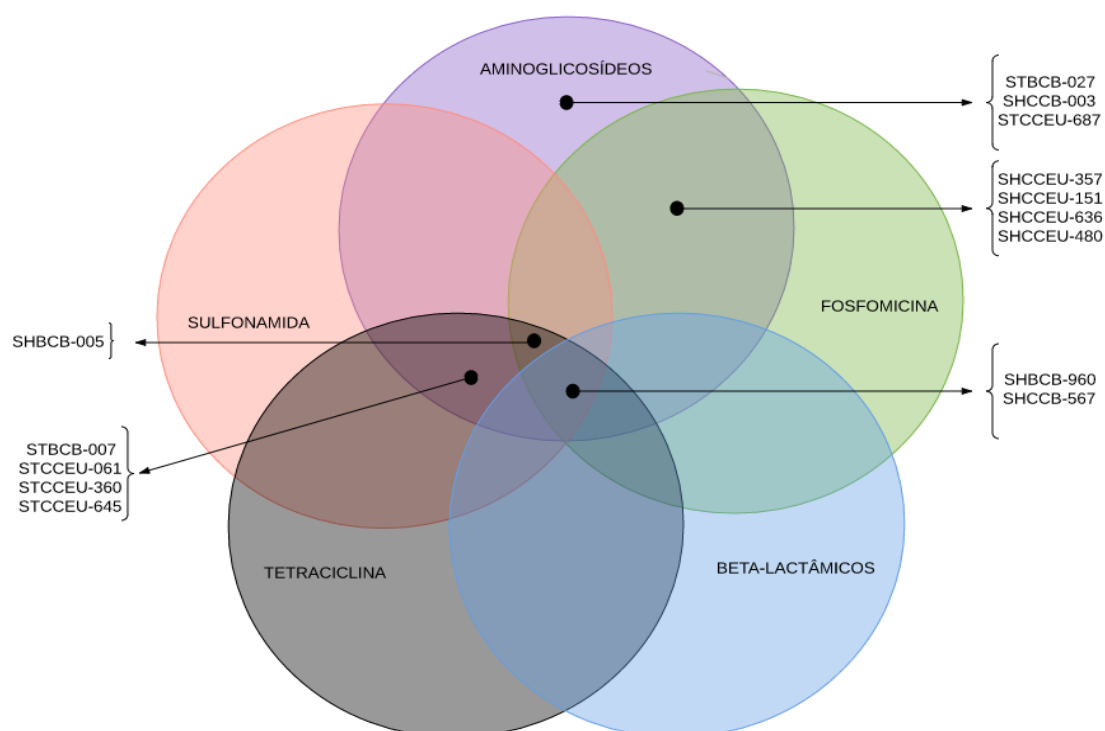


Figura 2: Diagrama de Venn com amostras de SH e STM do Brasil e EUA representadas por código e distribuídas em cinco conjuntos (círculos sobrepostos) que representam as classes dos antimicrobianos.

5.2. Presença de Plasmídeos

De todos os isolados estudados 78,58% apresentaram sequências plasmidiais, destes 57,14% apresentaram o plasmídeo *IncX1* (7 SH, sendo 3 do Brasil e 4 dos EUA e 1 STM dos EUA). A sequência *ColpVc* foi identificado em 50% (6 SH com 3 do Brasil e 3 dos EUA e 1 STM dos EUA). *IncA2* em 42,85% (3 SH do Brasil e 3 STM, 1 do Brasil e 2 dos EUA). *IncI1* foi identificado em 35,71% (4 SH sendo 2 do Brasil e 2 dos EUA e 1 STM do Brasil). Para 7,14% (1 STM do Brasil) foi isolado os plasmídeos *IncFIB(S)* e *IncFII(S)*. Esses resultados estão representados na tabela 2 e figura 3.

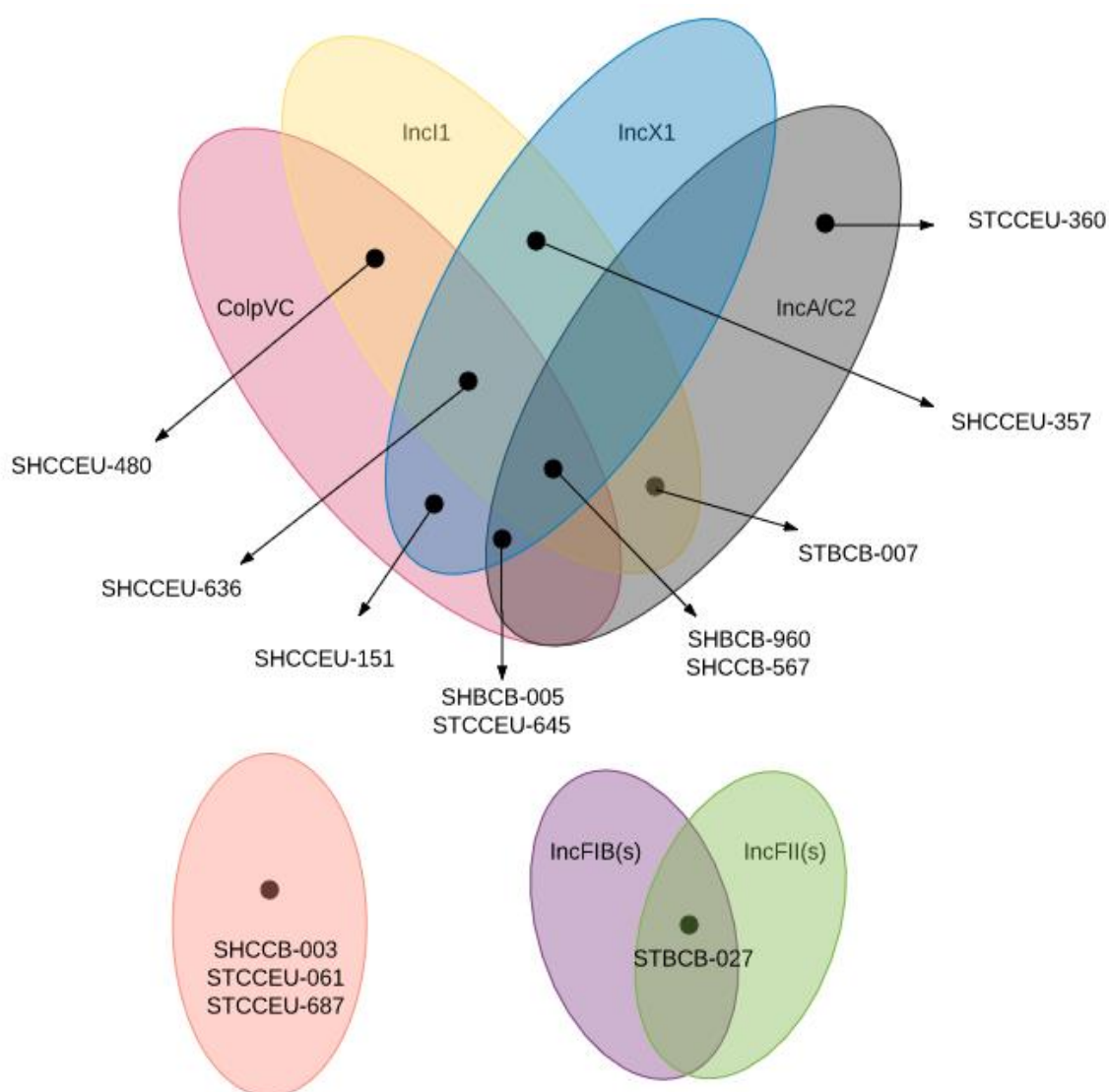


Figura 3: Diagrama de Venn representando as amostras codificadas de SH e STM relacionadas de acordo com a presença ou ausência dos plasmídeos.

5.3. Presença de SPI

Dos 14 isolados de *Salmonella*, apenas 9 foram utilizados para construção do gráfico em anel, isso porque alguns apresentaram semelhança entre si.

Na figura 4 é possível observar a distribuição das ilhas de patogenicidade (SPIs) entre as SH e STM. As amostras SHBCB-960, SHBCB-005, SHCCB-567 e STBCB-007 apresentaram homologia reduzida na SPI-1 quando comparado à referência, enquanto a amostra SHCCB-003 apresentou baixa homologia na SPI-3. O isolado STCCEU-687 apresentou homologia baixa nas SPI-1 e SPI-3 quando comparada com os genes de mesma região do referencial. A homologia reduzida é identificada através de “falhas” no *Ring-graphic*.

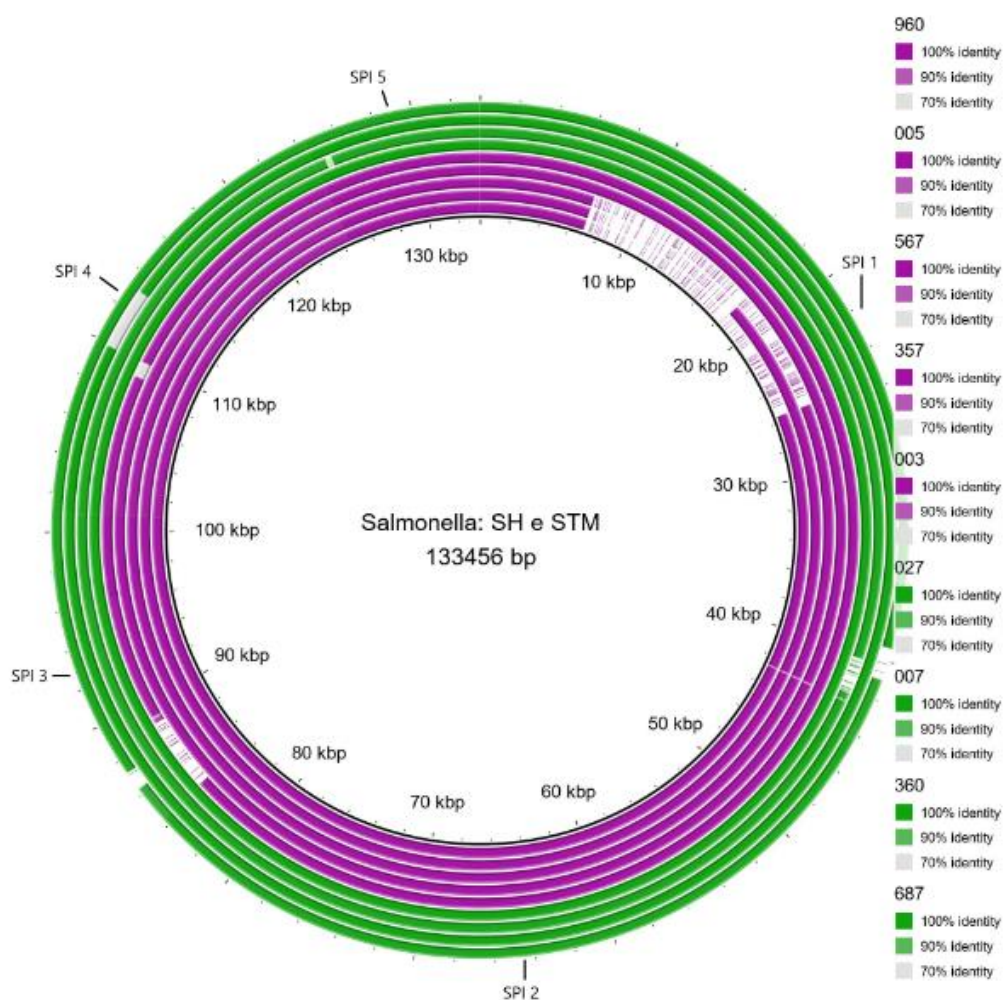


Figura 4: *Ring-graphic* da presença das ilhas de patogenicidade entre 9 *Salmonellas*, sendo 4 SH na cor roxo e 5 STM na cor verde, dos EUA e do Brasil. Intensidades das cores representam porcentagem de identidade com cepa de referência (*Salmonella*-LT2).

Houve baixa identidade referente a referência utilizada em SPI-4 para as amostras STCCEU-360 e SHCCB-003, enquanto a amostra STBCB-007 para a SPI-5. A baixa identidade é observada na representação gráfica do anel das amostras como alterações na coloração (cinza).

5.4. Análise Filogenética

A árvore filogenética foi construída a partir de 14 genomas diferentes de *Salmonella* sendo 6 do Brasil (4 SH e 2 STM), 8 dos Estados Unidos da América (EUA) (4 *S. Heidelberg* e 4 *S. Typhimurium*). Os SNPs (Polimorfismo de Nucleotídeo Único) foram pareados um a um e assim comparando todos os genomas. Obteve-se 3 *clades*, onde as amostras referentes as SH se mostraram próximas independente do País em um *clade* (4 SH do EUA e 3 SH do Brasil), exceto uma amostra referente ao Brasil. Em outro *clade* foi obtido com as STM (3 dos EUA e 1 do Brasil), exceto uma STM do Brasil e outra dos EUA, o terceiro *clade* abrangeu as exceções dos *clades* anteriores (mistas) e a referência (2 STM, sendo uma dos EUA e a outro do Brasil e uma SH do Brasil) (Figura 5).

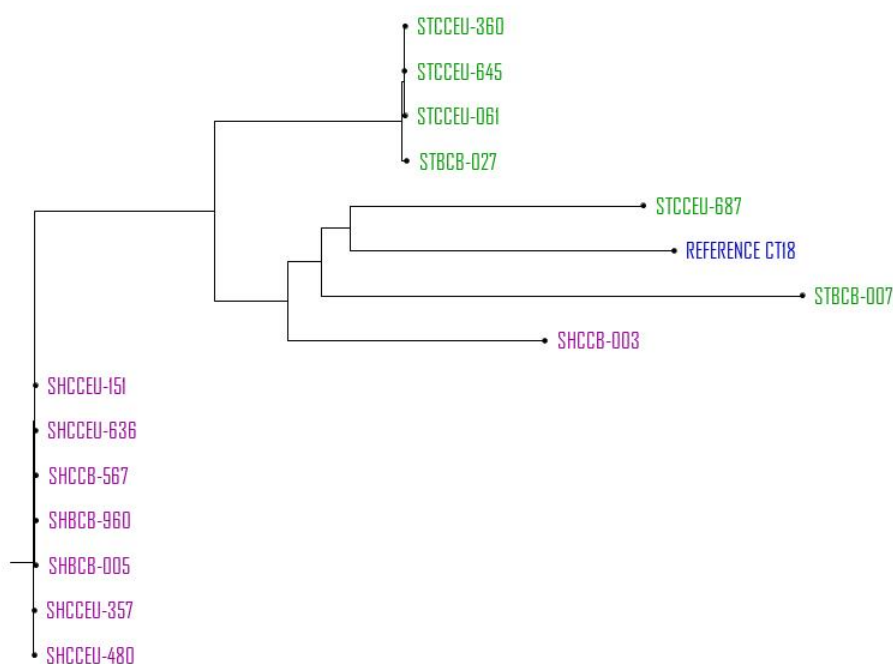


Figura 5: Análise filogenética de 14 amostras de *S. Heidelberg* identificadas em roxo e *S. Typhimurium* na cor verde. Todas estão identificadas por um código que descreve o sorovar, isolado e País; Isolado em azul refere-se à cepa-referência CT18 (*Salmonella* Typhi) utilizada para montagem da árvore filogenética.

6. DISCUSSÃO

Patógenos resistentes a antimicrobianos são preocupantes para as autoridades de saúde humana e animal, dentre eles a *Salmonella* spp., pois está entre as bactérias resistentes com potencial patogênico mais comumente relatadas no Brasil (WHO/OMS, 2019). Diante da relevância de *Salmonella* spp. para a saúde pública e veterinária e da necessidade de melhor compreensão as informações genéticas ligadas à resistência antimicrobiana e à virulência de sorotipos emergentes, elaborou-se o presente estudo.

Os resultados deste estudo indicam resistência a diferentes antimicrobianos nas enterobactérias do gênero *Salmonella*, sorotipos Heidelberg (SH) e Typhimurium (STM), analisadas. Fato também descrito em outros trabalhos realizados com esses sorotipos, no Brasil e nos Estados Unidos. (PANDINI et al., 2015; ALMEIDA et al., 2018; MCMILLAN et al., 2019; MCDERMOTT et al., 2016). No presente estudo, tanto as amostras de SH e STM isoladas no Brasil, como as isoladas nos EUA, apresentaram genes de resistência a antimicrobianos. No entanto, percebe-se que os isolados de SH de origem brasileira apresentaram resistência a uma maior variedade de classes de antibióticos (aminoglicosídeos, fosfomicinas, beta-lactâmicos, sulfonamidas e tetraciclinas) quando comparados às SH de origem no EUA, estas apresentaram resistência apenas aos aminoglicosídeos e fosfomicinas. ANTONY et al. (2018) identificaram resistência antimicrobiana em isolados SH do Brasil e dos EUA com ao menos um gene para as amostras, apresentando resistência para os aminoglicosídeos, beta-lactâmicos, sulfonamidas, tetraciclinas e quinolonas.

No Brasil, PANDINI et al. (2015) demonstraram em seu estudo que os isolados de SH apresentaram resistência a antibióticos pertencentes as classes dos beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, sulfonamidas e tetraciclinas. Enquanto que MION et al (2014) relataram resistência apenas aos beta-lactâmicos e aos aminoglicosídeos em isolados de SH.

Por outro lado, os isolados de STM analisados, apresentaram resistência a classes de antibióticos semelhantes, independentemente do país de origem (Brasil ou

EUA). Foram identificados genes de resistência aos aminoglicosídeos, sulfonamidas e tetraciclina. Os dados desta pesquisa estão de acordo com os apresentados por ALMEIDA et al., (2018) e MCDERMOTT et al. (2016), os quais identificaram ainda resistência aos beta-lactâmicos.

Genes que conferem resistência a cinco classes de antimicrobianos foram encontrados no presente trabalho. O gene *aac(6')/Ia*, que confere resistência aos aminoglicosídeos, foi encontrado em todas as amostras. TYSON et al. (2015) identificaram outros genes de resistência aos aminoglicosídeos, mas não o *aac(6')/Ia*. Os aminoglicosídeos fazem parte de uma das principais escolhas para o tratamento de infecções graves causadas por bactérias Gram-negativas em aves, incluindo fármacos como amicacina, estreptomicina e gentamicina, apesar de isolados resistentes estarem sendo identificados em amostras de frangos (DOU et al., 2016).

O gene de resistência à classe das fosfomicinas (*fosA7*) foi identificado em todas as amostras de SH do Brasil e dos EUA, contrariamente as de STM que não possuíam esse gene. Segundo MCMILLAN et al., (2019) resistência à fosfomicina foi detectada em sorotipos de *Salmonella*, porém conferida por um gene distinto, o *fosA2*. O mesmo aconteceu com resistência aos beta-lactâmicos. Nesse caso apenas os isolados de SH oriundos do Brasil apresentaram o gene *blaCMY-2*. Diferentemente do estudo realizado por MCMILLAN et al., (2019) que identificou o gene *blaCMY-2* em diversos sorotipos isolados nos EUA. Enterobactérias que apresentam síntese de β -lactamase de espectro estendido, incluindo resistência às cefalosporinas, causam aproximadamente 26.000 infecções ao ano (CDC, 2013). Glenn et al., (2013) também relataram a detecção de genes resistência aos aminoglicosídeos, beta-lactâmicos e tetraciclina semelhantes aos encontrados no presente estudo em isolados de *Salmonella* dos EUA e Canadá.

Outros genes encontrados foram o *sul2* e *Tet(A)* que conferem resistência às sulfonamidas e às tetraciclina, respectivamente. Ambos presentes nas mesmas amostras de SH e STM do Brasil e em STM dos EUA. A resistência a esses antimicrobianos também foram relatadas em isolados de *Salmonella* em outros estudos realizados no Brasil e EUA (MCMILLAN et al., 2019; PANDINI et al., 2015). No Brasil a tetraciclina é considerada um dos antimicrobianos mais utilizados em humanos (CDDEP, 2015). Nos EUA é bastante utilizada na produção animal, fazendo parte do ranking das mais administradas (FDA, 2015).

De acordo com MCMILLAN et al. (2019), em seu estudo realizado com amostras nos EUA, além dos genes identificados em nosso estudo obtiveram outros genes que conferem resistência antimicrobiana a outros antibióticos.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária o uso excessivo de antibióticos em animais de produção contribui para a emergência de bactérias resistentes (ANVISA, 2018). O mesmo é relatado por GUARDABASSI e PRESCOTT (2015), os quais apontam como o uso de antibióticos por períodos prolongados para fins terapêuticos na medicina humana e animal induzindo a seleção de linhagens a bactérias resistentes. Porém nos Estados Unidos, um estudo realizado por SALOIS et al. (2016) analisou os impactos ambientais e econômicos diante da retirada de antibióticos da produção de frangos de corte considerada uma das principais atividades promovedoras de RAM e concluíram que essa ação causaria reflexo negativo na produção, bem como prejuízo econômico. Assim, recomenda-se o uso responsável dos antimicrobianos na produção animal (WHO, 2019).

Os plasmídeos são peças fundamentais na disseminação de resistência antimicrobiana. Vários plasmídeos contendo genes de resistência associados à família *Enterobacteriaceae* têm sido relatados (WAILAN et al., 2016; CARATOLLI, 2013; GLENN, 2013; MCMILLAN, 2019). No presente estudo, apenas três amostras não apresentaram plasmídeos, sendo duas STM dos EUA e uma SH do Brasil. As demais apresentaram de um a quatro sequências plasmidiais.

Os plasmídeos encontrados foram *ColpVC*, *IncA/C2*, *Incl1*, *IncX1*, *IncFIB(s)* e *IncFII(s)* (Tabela 2). Um levantamento a respeito da presença de plasmídeos em isolados de *Salmonella* spp. demonstrou que o gene *ColpVC* esteve presente na maioria das amostras de SH do Brasil e dos EUA e ainda em uma STM também dos Estados Unidos, o *IncA/C2* esteve em isolados de SH e STM do Brasil e STM dos EUA (GLENN et al., 2013).

O *IncA/C2* e *Incl1* também foram descritos em análises dos EUA e Canadá em isolados de *Salmonella* spp., incluindo SH e STM (GLENN et al., 2013). Enquanto que WORLEY (2018), em seu estudo identificou *ColpVC*, *Inca/C*, *Incl1*, *IncX1* e *IncFII*, esses replicões plasmidiais foram encontrados em diversos sorovares de *Salmonella* de diversos países.

As Ilhas de patogenicidade foram encontradas em todas as amostras, independente do sorotipo e/ou País. Estas são de extrema importância para sobrevivência da bactéria no interior do hospedeiro, principalmente as SPIs de um a

cinco. A SPI-1 codifica o T3SS-1 que apresenta um sistema de microagulha lesando a membrana da célula e permitindo o rearranjo do citoesqueleto da célula do hospedeiro e consequente invasão. As SPI-1 abrigam genes conservados em *Salmonella* (BÄUMLER; TSOLIS; HEFFRON, 2000; MARCUS et al., 2000; DHANANI et al., 2015). Três isolados de SH e uma STM do Brasil apresentaram baixa homologia nessa SPI, quando comparado a referência (Imagem 2). Quanto as SPI-2, nenhuma amostra apresentou alterações comparadas ao referencial SPI. Estas estão ligadas à habilidade da *Salmonella* em sobreviver nas células fagocíticas e replicar-se dentro de vesículas nas células eucarióticas (HENSEL, 2004).

Uma das amostras de STM dos EUA apresentou falha em sua estrutura nas SPIs 1 e 3 quando comparadas a referência. A SPI-3 é importante para a replicação intracelular, em que a bactéria precisa adaptar-se ao ambiente microbicida e pobre em nutrientes do fagossomo, o qual é limitado e assim promove o transporte de minerais a exemplo do Mg^{+2} (GARCIA-DEL, 1992). Outra amostra apresentou baixa identidade comparada a referência utilizada em SPI-4 para as amostras de STM dos EUA e SH do Brasil, e por fim uma STM do Brasil apresentou também baixa identidade na SPI-5. Deleções individuais em genes das SPIs 4 e 5 não parecem influenciar na virulência de *Salmonella* spp. (DESAI et al. 2013; RYCHLIK et al., 2009). No entanto, muitos fatores de virulência estão presentes na SPI-4 como o T1SS e ORFs similares a toxinas e SPI-5 codifica proteínas efetoras para os T3SS codificados por SPI-1 e SPI-2 (HENSEL, 2004).

Análise filogenética das amostras demonstrou que as SH e STM apresentaram-se em *clade* diferentes para seus respectivos sorotipos. Exceto três amostras, uma SH e outra STM do Brasil e uma SH dos EUA que se encontraram em um mesmo *clade* juntamente com a referência CT18. WORLEY (2018) identificou dois *clades* para esses sorovares.

7. CONCLUSÃO

Conclui-se que os isolados de *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Typhimurium analisados, apresentaram variações de genes que conferem resistência a antimicrobianos (*aac(6')-laa*, *fosA7*, *tet(A)*, *Sul2* e *blaCMY-2*), e variações na presença dos plasmídeos (*ColpVc*, *IncX1*, *IncA2*, *IncI1*, *IncFIB(S)* e *IncFII(S)*). Assim, as amostras analisadas demonstraram resistência à importantes classes de antimicrobianos de uso animal e humano (Aminoglicosídeos, Beta lactâmicos, Fosfomicinas, Sulfonamidas e Tetraciclinas) o que caracteriza risco à saúde pública.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/cloranfenicol.htm, 2018. Acessado em: 10/06/2019.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/cloranfenicol.htm, 2007. Acessado em: 10/06/2019.

ALIKHAN, N.-F. et al. BLAST ring image generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. **BMC Genomics**, v. 12, p. 402, ago. 2011.

ALMEIDA, F. et al. Phylogenetic and antimicrobial resistance gene analysis of *Salmonella* Typhimurium strains isolated in Brazil by whole genome sequencing. **Plos One**, v. 13, ed. 8, 2018.

ANDREWS, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput Sequence data. Available online <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>, Acesso em: 10 de Maio de 2019.

ANTONY, L. et. al. Genome divergence and increased virulence of outbreak associated *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Heidelberg. **Gut Pathogens** 2018.

AZIZ, R. K. et al. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. **BMC Genomics**, v. 9, p. 75, fev. 2008.

BATISTA, D. F. A. Análise comparativa dos genomas de *Salmonella enterica* SUBSP. *enterica* SOROVAR *Gallinarum* BIOVARES *Gallinarum* 287/91 E *Pullorum* 449/87 PARA IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES DE DIFERENÇAS (RODS), 2013.

BÄUMLER, A. J.; TSOLIS, R. M.; HEFFRON, F. Virulence Mechanisms of *Salmonella* and their Genetic Basis. In: WRAY, C.; WRAY, A. (Ed.). **Salmonella in Domestic Animals**, cap. 4, p. 57-72, ed. 1, Oxon: CABI Publishing, 2000.

BLONDEL, C. J. et. al. Contribution of the type VI secretion system encoded in SPI-19 to chicken colonization by *Salmonella enterica* serotypes *Gallinarum* and *Enteritidis*. **PloS One**, v. 5, n. 7, São Francisco, 2010.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, ago. 2014.

BONI, H. F. K.; CARRIJO, A. S.; FASCINA, V. B., Ocorrência de *Salmonella* spp. Em aviários e abatedouro de frangos de corte na região central de Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 12, no.1, 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. Janeiro de 2018. <<http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>> Acesso em 06 de fevereiro de 2019.

BUCKNER, M. M.; CROXEN, M. A.; ARENA, E. T.; FINLAY, B. B. A comprehensive study of the contribution of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SPI2 effectors to bacterial colonization, survival, and replication in typhoid fever, macrophage, and epithelial cell infection models. **Virulence**, Filadélfia, v. 2, n. 3, p. 208-216, 2011.

CARATTOLI A., Plasmids and the spread of resistance. **Int J Med Microbiol** 303, p. 298–304, 2013.

CARATTOLI, A. et al. PlasmidFinder and pMLST: in silico detection and typing of plasmids. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. AAC.02412-14, abr. 2014.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C., Divulgação Técnica, Salmonela Na Segurança Dos Alimentos. **Biológico**, São Paulo, v.70, n.1, p.11-13, jan./jun., 2008.

CARDOSO, T. G.; CARVALHO, V. M. Toxifecção alimentar por Salmonella spp. **Rev. Inst. Ciênc. Saúde**. v. 24, n. 2, p. 95 – 101, 2006.

CARVALHO, A. C. F. B.; CORTEZ, L. L., Salmonella spp. em carcaças, carne mecanicamente separada, lingüiças e cortes comerciais de frango. **Ciências Rural**, Santa Maria, vol.35, n.6, Nov./Dec. 2005.

CDC. 2008. Public Health Laboratory Information System (PHLIS): Salmonella surveillance, annual summary, 2006. CDC, Atlanta, GA. <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmonella.htm>. Acesso em: 10/02/2019.

CDC, Center for Disease Control and Prevention. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases. Salmonella, 2016.

CDC, Multistate Outbreak of Multidrug Resistant Salmonella Heidelberg Infection Linked to Foster Farms Brand Chicken, 2014.

CDC, Multistate Outbreak of Salmonella Typhimurium Linked to Chicken Salad, 2018.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Antibiotic resistance threats in the United States, Atlanta, 2014. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/index.html>, 2014. Acesso em 29 mai. 2019.

CENTER FOR DISEASE DYNAMICS, ECONOMICS & POLICY (CDDEP) Reproduction is authorized provided the source is acknowledged. The State Of The World's Antibiotics. 2015.

Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella* enterica serovar Typhi CT18. **Nature**, London, v. 413, n. 6858, p. 848-852, 2001.

CHITTICK, P.; SULKA, A.; TAUXE, R.V.; FRY, A.M. Summary of National Reports of foodborn outbreaks of *Salmonella* Heidelberg infections in the United States: clues for disease prevention. **Journal of Food Protection**, v.69, n.5, p.1150-1153. 2006.

CHART, L. Disponível em < https://www.lucidchart.com/documents/edit/0d2_b0aa9-e655-44de-90a6-81f20b6a2525/0> Acesso em: 03 de Junho de 2019.

DEBLAIS, L.; SCARIA, J.; RAJASHEKARA, G., Draft Genome Sequences of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serotype Heidelberg from Chicken and Turkey Farm Environments. Julie C. Dunning Hotopp, Editor. **Microbiol Resour Announc.** Nov 2018.

DELGADO-SUÁREZ, E. J. et al., Whole genome sequencing reveals widespread distribution of typhoidal toxin genes and VirB/D4 plasmids in bovine-associated nontyphoidal *Salmonella*. **Nature**. 2018.

DELGADO-SUÁREZ, E. J. et.al. Genomic surveillance links livestock production with the emergence and spread of multi-drug resistant non-typhoidal *Salmonella* in Mexico. **Journal of Microbiology**. Vol. 57, 2019.

DESAI, P. T. et. al. Evolutionary Genomics of *Salmonella* enterica Subspecies. **mBio**, Washington, v. 4, n. 2, 2013.

DICKEL, E. L. Utilização da microbiologia convencional, reação em cadeia pela polimerase (PCR) e ensaio imunoenzimático (ELISA) no monitoramento de *Salmonella* em carcaças de frango para o controle higiênico–sanitário do processo de abate, 2004, f. 133. (Tese de Doutorado) em Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

DHANANI, A. S.; BLOCK, G.; DEWAR, K.; FORGETTA, V.; TOPP, E.; BEIKO, R. G.; DIARRA, M. S., Correction: Genomic Comparison of Non-Typhoidal *Salmonella*

enterica Serovars Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg, Hadar and Kentucky Isolates from Broiler Chickens. **PLoS One**. 2015.

DOU, X. et al. Characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated in eastern China. **Gene**, v. 576, n. 1, Part. 2, p. 244–248, jan. 2016.

FIGUEIRA, R.; HOLDEN, D. W. Functions of the *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) type III secretion system effectors. **Microbiology, Reading**, v. 158, n. 5, 2012.

FINSTAD, S. et al., *Salmonella* and broiler production in the United states: relationship to foodborne salmonellosis. **Food Research Internacional**, v. 45, n.2, p. 789-794, 2012.

FITCH, F. M. et.al. β -Lactam Resistance Genes: Characterization, Epidemiology, and First Detection of bla CTX-M-1 and bla CTX-M-14 in *Salmonella* spp. Isolated from Poultry in Brazil—Brazil Ministry of Agriculture's Pathogen Reduction Program. **Microbial Drug Resistance**. v. 22, n. 2, 2016.

FOLEY, S. L.; LYNNE, A. M.; NAYAK, R., Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram- negative bacterial foodborne pathogens. **Infections, Genetic and Evolution**, Amsterdam, v. 9, p. 430–440, 2009.

Food and Drug Administration (FDA), (<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/default.htm>.) Acesso em: 19/05/2019.

GAST, R. K.; PORTER JÚNIOR, R. E.; HOLT, P. S. Applying tests specific yolk antibodies to predict contamination by *Salmonella* Enteritidis in eggs from experimentally infected laying hens. **Avian Diseases, Kennett Square**, v. 41, n. 1, p. 195-202, 1997.

GARCIA-DEL, P. F. et. al. Characterization of the micro-environment of Salmonella Typhimurium-containing vacuoles within MDCK epithelial cells. **Mol Microbiol**, v.6, ed. 22, p. 3289-97, nov, 1992.

GIERALTOWSKI, L. et.al. Salmonella Heidelberg Investigation Team. National Outbreak of Multidrug Resistant Salmonella Heidelberg Infections Linked to a Single Poultry Company. **Plos One**, 2016.

GLENN, L. M. et.al. Antimicrobial resistance genes in multi-drug resistant Salmonella enterica serovars isolated most frequently from animals, retail meat, and humans in the U.S. and Canada. **Microb Drug Resist**, p. 175–184, 2013.

GUARDABASSI, L.; PRESCOTT, J. F., Antimicrobial stewardship in small animal veterinary practice: from theory to practice. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, n.45, p. 361-376. 2015.

HAPFELMEIER, S. et.al. The Salmonella pathogenicity island (SPI)-2 and SPI- 1 type III secretion systems allow Salmonella serovar typhimurium to trigger colitis via MyD88- dependent and MyD88-independent mechanisms. **Journal of Immunology, Bethesda**, v. 174, n. 3, p. 1675-1685, 2005.

HENSEL M., Evolution of pathogenicity islands of Salmonella enterica. **Int J Med Microbiol**. 294:95-102, 2004.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S.J.; REIS E.M.F. Prevalência de sorovares de Salmonella isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.17, n.2, p.55-62,1997.

HOFFMANN, M. et al. "Comparative genomic analysis and virulence differences in closely related salmonella enterica serotype heidelberg isolates from humans, retail meats, and animals." **Genome biology and evolution**, vol. 6, ed. 5, p. 1046-68, may, 2014.

HOFFMANN, M. et. al. Tracing Origins of the Salmonella Bareilly Strain Causing a Food-borne Outbreak in the United States. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 213, ed.4, p. 502–508, feb, 2016. Disponível em: < <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv297> >; Acesso em: 20 jun. 2019.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. Bergey's: **manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wikins, p. 186-187, 1994.

INTERAGENCY COORDINATION GROUP ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE (IACG). Who, no time to wait: securing the future from drug-resistant infections. Report to the secretary-general of the United nations. April 2019. Disponível em: < [https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagencycoordination group/IACG_final_report_EN.pdf?ua=1](https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagencycoordination%20group/IACG_final_report_EN.pdf?ua=1) >; Acesso em 06 de junho 2019.

IZUMIYA, H. et. al. Whole-Genome Analysis of Salmonella enterica Serovar Typhimurium T000240 Reveals the Acquisition of a Genomic Island Involved in Multidrug Resistance via IS1 Derivatives on the Chromosome. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY. American Society for Microbiology**, v.55, p. 623–630, 2011.

KAAS, R. S. et al. Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. **PLOS ONE**, v. 9, n. 8, p. e104984, nov. 2014.

LAN, R.; REEVES, P. R.; OCTAVIA, S. Population structure, origins and evolution of major. Salmonella enterica clones. **Infection Genetics and Evolution**, n. 9, v. 5, p. 996-1005, 2009.

LEE, K. et al., Review of salmonella detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. **Food control**, v. 47, p. 264-276, 2015.

LEGGET, R. M.; RAMIREZ-GONZALES, R. H., Sequencing quality assessment tools to enable data-driven informatics for high throughput genomics. **Frontiers in Genetics**, v. 4, art. 288, dec, 2013.

LIU, B. T.; SU, W. Q., Whole genome sequencing of NDM-1-producing serotype K1 ST23 hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in China. **Journal of Medical Microbiology**. May, 2019.

MAJOWICZ, S.E.; MUSTO, J.; SCALLAN, E.; ANGULO, F.J.; KIRA, M.; O'BRIEN, S.J.; et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. **Clinical Infectious Diseases**; v. 50, p. 882-889, 2010.

MALDONADO, A. G. Ocorrência de *Salmonella* spp em amostras de carcaças e miúdos de frango obtidos em uma feira e um mercado municipal na zona oeste da cidade de São Paulo: Análise crítica entre a técnica convencional em meios de cultivo e reação em cadeia pela polimerase – PCR. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade de São Paulo, São Paulo, p.75, 2008.

MARCUS, S. L.; BRUMELL, J. H.; PFEIFER, C.G.; FINLAY, B.B.; *Salmonella* Pathogenicity islands: big virulence in small packages. **Microbes and Infection**, n. 2, p. 145–156, 2000.

MCDERMOTT, P.F.; TYSON, G.H.; KABERA, C.; CHEN, Y. L. I. C.; FOLSTER, J. P. et al. Whole-Genome Sequencing for Detecting Antimicrobial Resistance in Nontyphoidal *Salmonella*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 60, ed.9, p. 5515–20, 2016.

MCMILLAN, E. A. et. al. Antimicrobial Resistance Genes, Cassettes, and Plasmids Present in *Salmonella enterica* Associated With United States Food Animals. **Front Microbiol**, 2019.

MION, L. et. al. Perfil de resistência a antimicrobianos por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola em 2005 e 2009. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.42, p. 1197, 2014.

MÜLLER, A. J.; HOFFMANN, C.; GALLE, M.; VAN DEN BROEKE, A.; HEIKENWALDER, M.; FALTER, L.; MISSELWITZ, B.; KREMER, M.; BEYAERT, R.; HARDT, W. D. The *S. Typhimurium* effector SopE induces caspase-1 activation in stromal cells to initiate gut inflammation. **Cell host and microbe**, Cambridge, v. 6, n. 2, 2009.

OHL, M. E.; MILLER, S.I. Salmonella: a model for bacterial pathogenesis. **Annual Review Medical**, v.52, p.259-274, 2001.

OLDENKAMP, E. P. Predecessors: veterinarians from earlier times, Daniel Elmer Salmon (1850-1914) **Tijdschr Diergeneeskde**, v.129, p. 554–555, 2004.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations, **The review on antimicrobial resistance**. AMR, may 2016.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE (OPAS). Novos dados revelam níveis elevados de resistência aos antibióticos em todo o mundo. 29 de jan. 2018. Disponível em: <https://www.paho.org/bra.../index.php?option=com_content&view=article&id=5592:novos-dados-revelam-niveis-elevados-de-resistencia-aos-antibioticos-em-todo-o-mundo&Itemid=812> Acesso em 20 de jun. 2019

PANDINI, J. A. et.al. Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. **Animal Pathology**, 2014.

PANZENHAGEN, P.H.N. et. al. Comparative genome analysis and characterization of the *Salmonella* Typhimurium strain CCRJ_26 isolated from swine carcasses using whole-genome sequencing approach. **The Society for Applied Microbiology**, 2018.

PROROGA, Y. T.; CAPUANO, F.; CARULLO, M. R.; LA TELA, I.; CAPPARELLI, R.; BARCO, L.; PASQUALE, V., Folia Microbiol. **Praha**, jan 2016.

POOLE, K. Efflux pumps as Antimicrobial Resistance Mechanisms. **Annals of Medicine**, v.32, n.3, p.162-176, 2007.

PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA. SALMONELLA HEIDELBERG - Ceftiofur-related resistance in human and retail chicken isolates., 2006. Disponível em: <http://www.phacaspc.gc.ca/cipars-picra/heidelberg/pdf/heidelberg_e.pdf>;

RAFFATELLU, M; WILSON, R.P. et al. SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 contribute to Salmonella enterica serotype typhimurium invasion of epithelial cells. **Infect Immun**, v. 73, ed.1, p. 146-54, jan. 2005.

RAMBAUT, A. FigTree v1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, **University of Edinburgh**, Edinburgh. 2010.

REZENDE, C. S. M. et al. Sorovares de Salmonella isolados de carcaças de frangos de corte abatidos no Estado de Goiás, Brasil, e perfil de resistência a antimicrobianos. **Rev. Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 100, p. 199-203, 2005.

RODRIGUES, D. P. Perspectivas atuais e falhas no diagnostico antigênico de Salmonella spp: importância no reconhecimento dos sorovares circulantes, emergentes e exóticos. **Seminário internacional sobre salmonelose aviária**. 2830 JUNHO, 2011.

ROER, L. et al. Is the Evolution of Salmonella enterica subsp. enterica linked to restriction-modification systems? **mSystems**, v. 1, n. 3, p. 9-16, jun. 2016.

RYCHLIK, I, et al. Virulence potential of five major pathogenicity islands (SPI-1 to SPI-5) of Salmonella enterica serovar Enteritidis for chickens. **BMC Microbiology**, 2009.

SALOIS, M. et. al. "The impact of antibiotic-free production on broiler chicken health: an econometric analysis," **Southern Agricultural Economics Association**, San Antonio, Texas, p. 6-9, feb. 2016.

SHINOHARA, N. K. S. et. al. Salmonella spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, p.1675-1683, 2008.

SONDA, T. et. al. Whole genome sequencing reveals high clonal diversity of *Escherichia coli* isolated from patients in a tertiary care hospital in Moshi, Tanzania. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, 2018.

SOUZA, I.D.P. Heidelberg é a salmonela da vez. **O presente rural** - Avicultura, corte e postura, Paraná, p.28, fev./mar. 2015.

STERZENBACH, T. et.al. Salmonella Virulence Mechanisms and their Genetic Basis. In: BARROW, P. A.; METHNER, U. (Eds.). *Salmonella in Domestic Animals*. **Oxfordshire: CAB International**, ed. 2, cap. 5, p. 80-103, 2013.

TASMIN, R. et al. Genotypic and phenotypic characterization of multidrug resistant *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Kentucky strains recovered from chicken carcasses. **Plos One**, v. 12, ed. 5, 2017.

TAUNAY, A. E. et al. The role of Public Health Laboratory in the problem of salmonellosis in São Paulo, Brasil. **Revista Inst. Med. Trop.** São Paulo, v. 38, p. 119-127, 1996.

TYSON, G.H, et.al. WGS accurately predicts antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, ed.10, p. 2763–2769. October, 2015.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE FOREIGN AGRICULTURAL Service. Office of Global Analysis. **Foreign Agricultural Service/USDA**, p. 18-19, April 2019.

VAN ASTEN, A. J. A. M. et. al. *Salmonella* entry: M cells versus absorptive enterocytes. **Veterinary Microbiology**, v.108, p.149- 152, 2005.

VOSS-RECH, D. et. al. temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. **Poult Sci**. 2015.

WALKER, M. T, et. al. Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: a retrospective observational study. **The Lancet infectious diseases**, v. 13, ed. 2, p. 137-146, feb. 2013.

WANG, X. et. al. Antibiotic Resistance in *Salmonella* Typhimurium Isolates Recovered From the Food Chain Through National Antimicrobial Resistance Monitoring System Between 1996 and 2016. **Front Microbiol.** 2019.

WASYL, D. et. al. High-level fluoroquinolone resistant *Salmonella* enterica serovar Kentucky ST198 epidemic clone with IncA/C conjugative plasmid carrying blaCTX-M-25 gene. **Veterinary Microbiology**, 2014.

WATTAM, A. R. et al. PATRIC, the bacterial bioinformatics database and analysis resource. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D581–D591, jan. 2014.

WORLEY, J. J. et. al. *Salmonella enterica* Phylogeny Based on Whole-Genome Sequencing Reveals Two New Clades and Novel Patterns of Horizontally Acquired Genetic Elements. **Timme mBio**, Nov 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), Report on surveillance of antibiotic consumption: 2016-2018 early implementation. Geneva; 2018. Licence: CCBY-NC-SA 3.0 IGO.

WAILAN, A. et. al. Mechanisms Involved in Acquisition of bla NDM Genes by IncA/C2 and IncFII Y Plasmids. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.60, ed. 7, p. 4082-88, jul 2016.

WATERMAN, SR. HOLDEN, D.W. Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. **Cell Microbiol**, v. 5, ed. 8, p. 501-11, Aug, 2003.

YANG, S. SHI, Z. OU, X. LIU, G. Whole-genome resequencing reveals genetic indels of feathered-leg traits in domestic chickens. **J. Genet**, v .5, ed. 2, p. 98, jun 2019.

ZANKARI, E. et. al Identification of acquired antimicrobial resistance genes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Dynmark, p. 1-5, july.2012.